基础研究

抗纤灵对5/6肾切除诱导慢性肾脏纤维化小鼠模型细胞外基质的影响

麻志恒[1,2],钟利平[1],余柯娜[1],何立群[1]

[1]上海中医药大学附属曙光医院肾病科,上海 201203;[2]上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院,上海 202150

摘要:目的 探讨抗纤灵对5/6肾切除诱导的慢性肾脏纤维化小鼠模型肾组织细胞外基质(ECM)的影响。**方法** C57BL/6J雄性小鼠,采用5/6肾切除制备慢性肾脏纤维化模型,2周后根据肌酐水平把手术组小鼠分为模型组,雷帕霉素和抗纤灵组,同时设立假手术组,每组10只,雷帕霉素,抗纤灵组分别给予雷帕霉素(0.00 016 g/kg),抗纤灵(0.4 g/(kg·d)灌胃治疗,模型组和假手术组等量蒸馏水,连续用药4周后处死小鼠,免疫荧光法测定肾组织I型胶原(Col Ⅰ),Ⅲ型胶原(Col Ⅲ),α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)纤维化面积;RT-PCR法检测肾组中,ColI,Col Ⅲ,α-SMAmRNA的表达。**结果** 与假手组比较,模型组ColI,Col Ⅲ,α-SMA胶原纤维化面积比值明显增加,ColI,Col Ⅲ,α-SMAmRNA显著增高(P<0.01),与模型组比较,雷帕霉素,抗纤灵组胶原纤维面积比值,mRNA表达水平均有所降低(P<0.01)。雷帕霉素与抗纤灵组比较,两者之间无显著性差异。**结论** 抗纤灵具有雷帕霉素类似的作用,能够通过抑制小鼠肾组织ColI, Col Ⅲ,α-SMAmRNA的表达,减少ColI,Col Ⅲ,α-SMA纤维化面积,对肾纤维化有一定的改善作用。

关键词: 抗纤灵;慢性肾纤维化;细胞外基质;I型胶原;Ⅲ型胶原;α-平滑肌肌动蛋白

Effects of kangxianlin on Extra cellular Matrix Depodition in 5/6 nephrectomized inducedchronic renal failure mice kidney tissue

MA Zhiheng[1,2], ZHONG Liping[1], YU kena[1], He liqun[1]

[1]Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203 ,China; [2] Xinhua hospital chongming branch affiliated to Shanghai jiaotong university school of medicine, Shanghai 202150, China

Abstract: Objective To determine effects of Kangxianling decoction (KXLD) on Extracellular Matrix (ECM) Depodition in 5/6 nephrectomized-induced chronic renal failure mice kidney tissue. **Methods** SPF C57BL/6J male mice weighing18-22g, divided into sham group and surgrey group, establish an model of chronic renal failure caused by 5/6 nephrectomized . Two weeks later after surgrey, according to serum creatinine(Scr) level, the mices were divided into model group, KXLD and rapamycin (RAP) group, so Scr level between the surgrey groups was no significant difference(P>0.05). KXLD and RAP were gavaged respectively according to 0.4 g/kg 0.00016 g/kg/day. sham and model group are the same amount of distilled water. After 4 weeks of treatment, Collagen area and mRNA expression of Collagen Type I(ColI), Collagen Type Ⅲ (Col Ⅲ), α-smooth muscle actin,(α-SMA) were Observed by immunofluorescence and real-time PCR method. **Results** Compared with sham group, the levels Collagen area and mRNA expression of ColI, Co Ⅲ, α-SMA increased significantly in the model group(P<0.01), Compared with model group, the levels Collagen area and mRNA expression of ColI, Col Ⅲ, α-SMA decreased significantly in the KXLD and RAP group (P<0.01).Compared with KXLD and RAP, there have no different (P>0.05). **Conclusion** KXLD is able to decreased the level of Collagen area ,inhibited mRNA expression of ColI, Col Ⅲ, α-SMA and have the similar effection as RAP.

Key word: Kangxianlian decoction; chronic renal fibrosis; ECM; ColI; Col Ⅲ; α-SMA

肾间质纤维化是引起慢性肾衰的主要因素之一,而引起肾间质纤维化的原因主要包括各种细胞因子,生长因子等导致的炎症反应,细胞增殖等,另一条主要的原因就是肾组织细胞外基质(ECM)的沉积[1]。ECM主要包括胶原蛋白,纤连蛋白,蛋白多糖以及糖蛋白,均由肾小球固有细胞所分泌,正常情况下其生成和降解处于动态平衡中,在许多因子如转化生长因子,炎症因子等作用下,其动态平衡被打破,最终导致ECM的沉积,进而引起肾间质纤维化。

研究表明激活mTOR信号通路能够激活巨噬细胞和肌成纤维细胞,加重纤维化的形成[2-4],而使用雷帕霉

收稿日期:2015-11-15

基金项目:国家自然基金面上项目(81373615);国家临床重点专科建设;国家中医药管理局重点专科建设

作者简介:麻志恒,E-mail: zhiheng_macm@163.com

通信作者:何立群,E-mail: zhiheng_macm@163.com

素能够抑制mTOR通络,可以明显减肾间质的炎症和纤维化,延缓肾功能丧失[5-8]。我们的前期研究表明抗纤灵能够通过抑制TGF-β1/ Smad信号通路,改善大鼠肾衰模型肾脏的纤维化[9-13],但抗纤灵是否能够通过mTOR信号通络,减轻肾衰模型小鼠肾组织的ECM,本文做了进一步探索。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 *动物* 清洁级C57BL/6J小鼠40只,体质量为18~22 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供(许可证号:SCXK(沪)2008-0016)。小鼠分笼饲养于上海中医药大学实验动物中心,予12 h光照,45 ℃湿度的环境中,自由饮水,进食标准普通饲料,适应性喂养1周后进行实验。

1.1.2 *药物* 由丹参15 g,桃仁12 g,当归12 g,怀牛膝15 g,酒大黄9 g组成,由上海曙光医院中药房提供,药材经生药学专家鉴定,保存样品备查,按传统方式加水煎煮制备水煎液。灭菌后−20 ℃保存备用。雷帕霉素粉剂10 mg,购自上海威奥生物 ,批号:R706203,分别按照0.4 g/kg,0.0016 g/kg,0.5 mL/d/只小鼠配成溶液。

1.1.3 *主要试剂* 磁珠法RNA抽提试剂盒购自TOYOBO;逆转录试剂盒:Prime Script RT reagent Kit(TaKara);SYBR Premix Ex Taq(TaKara),兔抗鼠ColI,Col Ⅲ,α-SMA抗体,单克隆羊抗兔荧光抗体(美国Cell Signaling)。

1.1.4 *主要仪器* 5417R型高速低温离心机(德国Eppendorf),ELX800型酶标仪(美国Bio-Tek),Mini Protean Cell小型垂直电泳电泳槽(美国Bio-Rad),CFX-96荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad)。Nano Vue TM-plus 核酸蛋白测定仪(美国GE healthcare)。

1.2 方法

1.2.1 *5/6肾切除诱导的慢性肾脏纤维化模型的建立(Platt法)* 以3%戊巴比妥钠按40 mg/kg剂量腹腔注射麻醉,小鼠俯卧位暴露左肾区,在距左脊肋骨1.5 cm处做斜向外的切口,经后腹膜取出左肾,并暴露于外,剥离肾周脂肪及包膜后,弧形切除2/3肾组织(主要切除皮质部分),消毒棉球压迫止血,观察切面无活动性出血后复位剩余左肾,然后逐层缝合腹膜、肌肉及皮肤,7 d后以相同的方法麻醉小鼠,完全游离右肾肾蒂后结扎,行右肾摘除,然后逐层缝合腹膜、肌肉及皮肤。2次手术共切除肾脏约80%。假手术组仅在手术时作背部切口,打开肾区皮肤肌肉并暴露肾脏后再缝合伤口。

实验分组及给药:40只小鼠随机选取10只作为假手术组,其余为手术组,按以上方法制作慢性肾衰模型。2周后采用小鼠眼内眦取血,测血肌酐水平。将模型成功小鼠按血肌酐水平分为模型组(10只),雷帕霉素组(10只)、抗纤灵组(10只)、使各组之间的血肌酐值无统计学差异(P>0.05)。雷帕霉素,抗纤灵组分别给予雷帕霉素(0.0016 g /kg),抗纤灵(0.4 g/kg)各0.5 mL/d灌胃治疗,模型组和假手术组等量蒸馏水,连续用药4周。

1.2.2 *实验标本收集及指标检测方法* 处死前1 d禁水6 h,以3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,摘取左侧残肾,用生理盐水冲洗,冰上操作,除去血污及脂肪等组织,肾脏组织一部分甲醛固定,行免疫荧光染色,并计算纤维化面积,另一部分入冷存管,存放于液氮罐中,运用RT-PCR法检测肾脏组织中ColI,Col Ⅲ,α-SMAmRNA的表达。

1.2.3 *免疫荧光染色及观察胶原纤维面积比值* 每组随机选取6个标本作为观察对象,每个标本取9张切片,分别用于ColI,Col Ⅲ,α-SMA免疫荧光染色,具体步骤为:取肾组织4 μm常规石蜡切片脱蜡至水,抗原修复,0.4%胃蛋白酶消化30 min,10%正常羊血清封闭10 min,经PBS,10 min/次,3次洗涤后分别加入兔抗鼠ColI,Col Ⅲ,α-SMA抗体(1∶300),4 ℃孵育过夜;次日PBS15 min/次,洗涤3次后滴加单克隆的羊抗兔荧光抗体(1∶200, ALexa488),室温下摇床2 h(避光),PBS15 min/次,洗涤3次后(避光)加DAPI,抗衰变封片剂(聚乙烯醇-缓冲甘油混合介质)封片,日本LEICA-TCSSP2型激光共聚焦荧光显微镜下观察,双通道扫描采集图像,通过双通道荧光集成图像观察肾组织中的ColI,Col Ⅲ,α-SMA表达表达。

计算机图象半定量分析:所有经免疫荧光染色的切片均于实验结束时由操作人员在单盲情况下逐一在显微镜下读片,每例切片平均选取5个不同视野,应用LEICA多功能真彩色病理图象分析系统进行图像分析,测定纤维化阳性染色面积占整个视野面积的比值、即阳性面积率,取其平均值作为该切片纤维化面积的测定值。

1.2.4 *RT-PCR法测定ColI,Col Ⅲ,α-SMAmRNA的表达* 实验前所有器具去RNA酶处理,取−80 ℃保存的小鼠肾组织100 mg,提取总RNA,选取OD_{260}/OD_{280}均在1.8~2.0的样本进入下一轮反转录反应。应用Real-time PCR Master Mix的方法进行Real- time PCR。以GAPDH为内参对照。引物序列:ColI:上游引物5'-AGCCAGTCGCATCAGGAACC-3',下游引物5'-GGGAGCATCATCAC -3';扩增片段长度175 bp;ColII:上游引物5'-AGATGCTGGTGCTGAGAAG -3',下游引物5'-TGGAAGAAAGTCTGAGGAAGG -3',扩增片段长度134 bp;α-SMA:上游引物5'-AAGAGGAAGACAGCACAECTC-3',下游引物5'-GATGGATGGGAAAACAGCC-3',扩增片段长250 bp; GAPDH:上游引物5'-GCTCGCTGTGAACGGATTTG-3',下游引物5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA -3',扩增片段

长度309 bp,上述引物均由上海生工生物技术公司合成。PCR反应体系20 μL,蒸馏水6.8 μL,cDNA 2 μL,上、下游引物各0.4 μL,ROX Reference Dye 0.4 μL,PCRMix 10 μL。反应条件采用二步法:95 ℃ 30 s预变性;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40个循环。数据采用StepOne Software V2.1计算分析。

1.3 统计学处理

应用SPSS13.0软件进行处理,计量资料用均数±标准差表示,组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA)。

2 结 果

2.1 抗纤灵对各组小鼠肾组织ColI,ColⅢ,α-SMA表达的影响

光镜下观察,免疫荧光染色结果显示:假手术肾组织中ColI,ColⅢ,α-SMA荧光表达较少,模型组中有较多的胶原纤维沉积,雷帕霉素,抗纤灵组胶原纤维的面积与模型组比较明显减少(图1~3)。

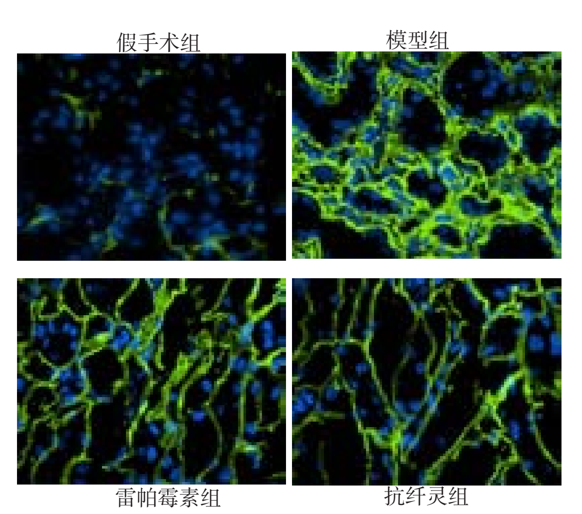


图1 各肾组织中ColI的表达:细胞核(蓝色),胶原表达(绿色),原始图片×400

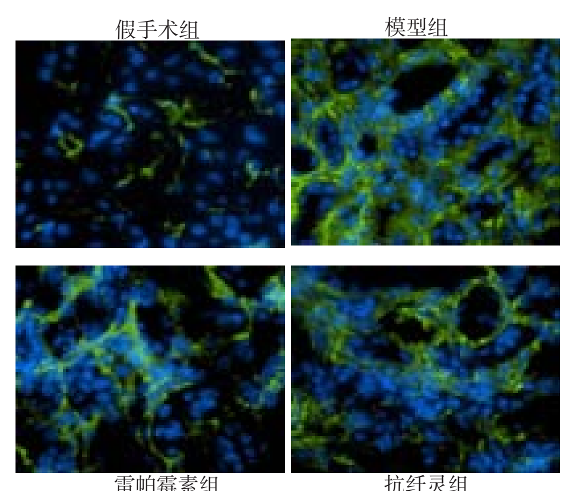


图2 各肾组织中ColⅢ的表达:细胞核(蓝色),胶原表达(绿色),原始图片×400

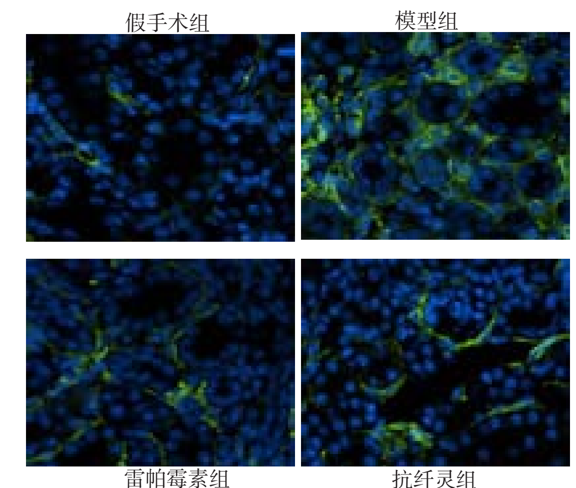


图3 各肾组织中α-SMA的表达:细胞核(蓝色),胶原表达(绿色),原始图片×400

2.2 抗纤灵对各组小鼠肾组织ColI,ColⅢ,α-SMA相对荧光面积比值影响的比较

使用图像处理系统测量胶原纤维阳性区占所观察视野的面积比,结果发现,与假手术组比较,模型组荧光面积比例明显增加($P<0.01$),与模型组比较,雷帕霉素,抗纤灵组荧光面积比例明显下降($P<0.01$),但两治疗组之间比较,没有显著性差异($P>0.05$,表1)。

表1 各组小鼠肾组织ColⅡ,ColⅢ,α-SMA相对荧光面积比较(n=6)

组别	ColI	ColⅢ	α-SMA
假手术组	3.46±0.36	4.04±0.24	3.17±0.59
模型组	20.89±1.97**	22.06±1.80**	14.30±0.80**
雷帕霉素组	12.25±1.20##	12.74±1.27##	10.10±0.97##
抗纤灵组	12.01±0.97##	13.75±1.30##	11.33±1.56##

*$P<0.05$ *vs* 假手术组; **$P<0.05$ *vs* 假手术组; #$P<0.05$ *vs* 模型组; ##$P<0.01$ *vs* 模型组.

2.3 各组小鼠肾组织ColI,ColⅢ,α-SMAmRNA相对表达量的比较

与假手术组相比,模型组ColI,ColⅢ,α-SMA表达量显著升高($P<0.01$),与模型组相比,雷帕霉素,抗纤灵组ColI,ColⅢ,α-SMAmRNA表达量显著下调($P<0.01$),雷帕霉素与抗纤灵比较,两者之间无显著性差异($P>0.05$,表2)。

表2 各组肾组织ColⅡ,ColⅢ,α-SMAmRNA相对表达量比较

组别	n	ColI	ColⅢ	α-SMA
假手术组	9	0.25±0.03	0.13±0.04	0.31±0.03
模型组	8	0.57±0.08**	0.39±0.03**	0.57±0.06**
雷帕霉素组	9	0.35±0.05##	0.27±0.03##	0.44±0.05##
抗纤灵组	8	0.37±0.03##	0.28±0.03##	0.45±0.04##

*$P<0.05$ *vs* 假手术组; **$P<0.01$ *vs* 假手术组; #$P<0.05$ *vs* 模型组; #$P<0.01$ *vs* 模型组.

3 讨论

ECM是细胞骨架的延伸,其能够影响细胞的生长,发育与死亡,可以决定细胞的形状,控制细胞的分化,参与细胞的转移,细胞通过ECM的黏附作用而产生的力能够动态地感知周围环境的变化[14],在炎症,免疫反应,毒素等因素的刺激下,间质成纤维细胞被激活,出现增殖和表型改变,表达α-SMA蛋白,分化为肌成纤维细胞,主要合成和分泌Ⅰ,Ⅲ型胶原,加剧了ECM的聚集[15-16]。积聚的ECM一方面突入肾小球毛细血管壁,导致管壁增厚,管腔狭窄,另一方面积聚在肾小球内,导致肾小球硬化,造成肾脏功能进行性损害[17-18]。

mTOR通过调节其下游的信号分子如S6 kinase(S6k)和4E-binding protein-1(4EBP-1)等,对细胞的生长,繁殖,增生等起着重要的作用[19]。研究表明,通过调节mTOR的活性,能够调控胶原蛋白,纤连蛋白等ECM的合成和分泌[20], 而mTOR抑制剂, 则在许多组织纤维化疾病中具有很好的抗纤维化作用[21-24]。

可见,寻找防止细胞的增殖并阻断其分泌ECM的因素对防治肾脏疾病的发生和发展,延缓肾功能恶化具有重要的临床意义。本实验中,我们使用5/6肾切导致肾脏纤维化模型,采用雷帕霉素为对照药,拟从mTOR通路入手,观察抗纤灵对小鼠肾组织ECM的影响,结果表明,抗纤灵能够明显减少模型小鼠肾组织纤维化的面积,抑制ColI,ColⅢ,α-SMA基因的表达,疗效和雷帕霉素相似,因此我们推测,抗纤灵可能通过mTOR信号通路,或者至少参与了mTOR信号通路的调节,减轻肾脏的损害。

参考文献:

[1] 晏子友, 皮持衡, 陈洪根. 肾间质纤维化的研究进展[J]. 现代诊断与治疗, 2000, 11(5): 279-81.

[2] Lee DF, Hung MC. All roads lead to mTOR: integrating inflammation and tumor angiogenesis [J]. Cell Cycle, 2007(6): 3011-4.

[3] Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, et al. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway[J]. Cell, 2007, 130: 440-55.

[4] Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R. Noncanonical TGF-beta pathways, mTORC1 and Abl, in renal interstitial fibrogenesis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298: F142－9.

[5] Huber TB, Walz G, Kuehn EW. mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression[J]. Kidney Int, 2011 (7): 502-11.

[6] Wu MJ, Wen MC, Chiu YT, Chiou YY, Shu KH, et al. Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis[J]. Kidney Int, 2006(8): 2029-36.

[7] Lieberthal W, Levine JS. The Role of the Mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) in Renal Disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(12): 2493-502.

[8] Kramer S, Wang-Rosenke Y, Scholl V, Binder E, Loof T, et al. Low-dose mTOR inhibition by rapamycin attenuates progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis of the rat[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007(8): 51-2.

[9] Wang D, Zhang J, Chen G, et al. The influence of kangxianling on the source of bone marrow fibroblast tphenotype transformationin in 5/6 nephrectomy rat model[J]. 中国中医药信息杂志, 2012(9): 33-5.

[10] Liu YM, Zhang Y, He LQ, et al. The effect of kangxianling anti Renal interstitial fibrosis in rats[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2007, 27(10): 901-3.

[11] Zhang Y, Liu YM. Effect of Kang xianling Decoction on expression of hepatocyte growth factor mRNA and PhosPhorylations of extracellular signal-regulated Protein kinase l/2 and P 38 in renal tissue of rats with unilateral ureteral obstruction[J]. J of Chin Interg Med, 2007, 5(6): 656-8.

[12]Liu YM, Zhang Y, He LQ, et al. The effect of kangxianling onTGF-β 1-Smad signaling pathways in unilateral ureteral obstruction in rats [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(12): 2423-7.

[13] Zhang Y, Li J, Liu KJ, et al. The effect of kangxianling on Smad signaling pathways in adriamycin induced nephrotic rats [J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2007, 27(12): 1094-6.

[14] 赵 杨, 洪 莉, 洪莎莎, 等. 细胞外基质的硬度与细胞生物学功能的研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版), 2015, 36(1): 151-4, 164.

[15] Zeisbeng M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis [J]. J Am soc Nephrol, 2010, 21(11): 1819-34.

[16] 王 轩, 袁伟杰. 肾小管上皮细胞转分化类型及其在肾脏疾病进展中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(10): 1906-9.

[17] 钟 丹, 杨霓芝, 赵代鑫, 等. 中药复方"通脉口服液"对肾小球系膜细胞增殖及分泌IL-1β的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 4-6.

[18] 周必发, 张莹雯. 当归补血汤对高糖条件下系膜细胞增殖及细胞外基质表达的影响[J]. 武汉大学学报(医学版), 2008, 29(4): 476-81, 488.

[19] Hay N, Sonenberg N Upstream and downstream of mTOR [J]. Genes Dev, 2004(18): 1926-45.

[20] Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer [J]. Cancer Cell, 2005, 8(3): 179-183.

[21] Hay N, Upstream and downstream of mTOR [J]. Genes evelop, 2004, 18(16): 1926-45.

[22] Jiang L, Xu L, Mao J, et al. Rheb/mTORC1 signaling promotes kidney fibroblast activation and fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2013 (24): 1114-26.

[23]Chen G, Chen H, Wang C, et al. Rapamycin ameliorates kidney fibrosis by inhibiting the activation of mTOR signaling in interstitial macrophages and myofibroblasts[J]. PloS one, 2012,7(3): e33626.

[24] Wang W, Yan J, Wang H, et al. Rapamycin ameliorates inflammation and fibrosis in the early phase of cirrhotic portal hypertension in rats through inhibition of mTORC1 but not mTORC2[J]. PloS one, 2014,9(1): e83908.